

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/44934 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. August 2000 (03.08.00)
---	-----------	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00288

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Januar 2000 (27.01.00)

(30) Prioritätsdaten:
199 05 082.1 29. Januar 1999 (29.01.99) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee 24, D-10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexander [DE/DE]; Kyffhäuserstrasse 20, D-10781 Berlin (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9, D-10119 Berlin-Mitte (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht*Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING CYTOSINE METHYLATION PATTERNS IN GENOMIC DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIKATION VON CYTOSIN-METHYLIERUNGSMUSTERN IN GENOMISCHEN DNA-PROBEN

(57) Abstract

The invention relates to a method of identifying cytosine methylation patterns in genomic DNA samples. The inventive method comprises the following steps: a) chemically treating a genomic DNA sample in such a manner that the cytosine and the 5-methyl cytosine react differently and that the two products have a different base-pairing behavior in the duplex; b) enzymatically amplifying parts of the DNA sample treated in this manner; c) binding the amplified parts of the DNA sample treated in this manner to a surface; d) hybridizing a set of probes of different nucleic base sequences to the immobilized DNA samples, said respective base sequences containing at least once the dinucleotide sequence 5'-CpG-3'; e) removing the non-hybridized probes; f) analyzing the hybridized probes in a mass spectrometer, the position of the probes on the sample carrier allowing an allocation of the DNA sample to be hybridized; g) converting the peak-patterns obtained from the mass-specters to methylation patterns and matching the new data with a data library.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben, wobei man a) eine genomische DNA-Probe chemisch derart behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und man in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte erhält; b) Teile der so behandelten DNA-Probe enzymatisch amplifiziert; c) die amplifizierten Teile der so behandelten DNA-Probe an eine Oberfläche bindet; d) einen Satz von Sonden unterschiedlicher Nukleobasensequenzen, die jeweils mindestens einmal die Dinukleotidsequenz 5'-CpG-3' enthalten, an die immobilisierten DNA-Proben hybridisiert; e) die nicht hybridisierten Sonden abtrennt; f) die hybridisierten Sonden in einem Massenspektrometer analysiert, wobei die Position der Sonden auf dem Probenträger eine Zuordnung zu der hybridisierenden DNA-Probe erlaubt; g) Übertragung der aus den Massenspektren erhaltenen Peakmuster in Methylierungsmuster und Abgleich der neuen Daten mit einer Datenbank.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben.

10 Die genetische Information, die durch vollständige Sequenzierung genomischer DNA als Basenabfolge erhalten wird, beschreibt das Genom einer Zelle nur unvollständig. 5-Methylcytosin-Nukleobasen, die durch reversible Methylierung von DNA in der Zelle entstehen, sind ein epigenetischer Informationsträger und dienen beispielsweise zur
15 Regulation von Promotoren. Der Methylierungszustand eines Genoms repräsentiert den gegenwärtigen Status der Genexpression, ähnlich wie ein mRNA Expressionsmuster.

20 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse.
25 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüberhinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, die die 5-Methylcytosine tragen,
30 vollständig verloren.

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme zu lösen versuchen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische Behandlung der genomischen DNA durchgeführt,
35 in deren Folge sich die Cytosin- von den Methylcytosin-Basen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die

Umsetzung von genomischer DNA mit Bisulfit, die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-Methylcytosine ermitteln lassen (nur diese liefern noch eine Bande in der C-Spur).

Eine Übersicht über weitere bekannte Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, ist beispielsweise dem folgenden Übersichtsartikel zu entnehmen: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

Die Bisulphit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zeschnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 5, 94-98; Kubota T. et al., Nat. Genet. 16, 16-17) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulphit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. and Walter, J., Nat. Genet. 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalvo, M. L. and Jones, P.A., Nucl. Acids. Res. 25, 2529-2531) oder Enzymschnitt (Xiong, Z. and Laird, P.W., Nucl. Acids. Res. 25, 2532-2534) nachgewiesen. Alle diese Referenzen stammen aus dem Jahre 1997. Das Konzept, komplexe Methylierungsmuster zur Korrelation mit phänotypischen Daten komplexer genetischer Erkrankungen zu verwenden, ist lediglich in DE-19543065 A1 erwähnt. So wird hierin zum Beispiel die eigentliche Detektion nicht über die Analyse der Hybrisierung von Nukleinsäure-Sonden im Massenspektrometer durchgeführt.

Nicht immer ist es erforderlich, tatsächlich die gesamte Sequenz eines Gens oder Genabschnitts zu ermitteln, wie dies bei einer Sequenzierung das Ziel ist. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn wenige 5-Methylcytosin-Positionen innerhalb einer längeren Basensequenz für eine Vielzahl von unterschiedlichen Proben abzutasten sind. Die Sequenzierung liefert hier in großem Umfang redundante Information und ist zudem sehr teuer. Dies ist auch schon dann der Fall, wenn die Sequenz bereits bekannt ist und ausschließlich Methylierungspositionen dargestellt werden sollen. Auch ist es denkbar, daß in einigen Fällen überhaupt nur die Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen verschiedenen genomischen DNA-Proben von Interesse sind und daß auf die Ermittlung einer Vielzahl übereinstimmender methylierter Positionen verzichtet werden kann. Für die hier angeführten Fragestellungen existiert bislang kein Verfahren, das ohne Sequenzierung jeder einzelnen Probe, kostengünstig die gewünschten Ergebnisse liefert.

Sequenzinformation muß auch umso mehr immer weniger neu ermittelt werden, da die Genomprojekte, deren Ziel die vollständige Sequenz verschiedener Organismen ist, zügig voranschreiten. Vom menschlichen Genom sind zwar derzeit erst etwa 5 % fertig sequenziert, jedoch kommen jetzt, weil andere Genomprojekte dem Ende zuneigen und dadurch Sequenzierressourcen frei werden, jedes Jahr weitere 5 % dazu. Mit der Vervollständigung der Sequenzierung des menschlichen Genoms wird bis zum Jahre 2006 gerechnet.

Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ist eine neue, sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. and Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein Analytmolekül wird in ei-

ne im UV absorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix ins Vakuum verdampft und das Analyt so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere. Die Flugzeit wird in die Masse der Ionen umgerechnet.

- 10 Technische Neuerungen der Hardware haben die Methode signifikant verbessert. Erwähnenswert ist hierbei die „delayed extraction“-Methode (DE). Für DE wird die Beschleunigungsspannung mit einer Verzögerung zum Laserpuls eingeschaltet und dadurch eine verbesserte Auflösung der Signale erreicht, weil die Zahl der Stöße verringert wird.

- 20 MALDI eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100-mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Der Grund dafür liegt darin, daß für die Ionisation von Peptiden und Proteinen lediglich ein einziges Proton eingefangen werden muß. Für Nukleinsäuren, die ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. Für MALDI spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA sind zwar inzwischen einige geeignete Matrices gefunden worden, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungschemie in eine ladungsneutrale DNA umwandeln.

Die Kopplung eines "charge tags" an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit in den gleichen Bereich wie er für Peptide gefunden wird.

5 Durch diese Modifikationen hat sich auch die Möglichkeit eröffnet, ähnliche Matrices, wie sie für die Desorption von Peptiden verwendet werden, zu nutzen. Ein weiterer Vorteil von charge tagging ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren. PNAs und Methylphosphonatoligonukleotide sind mit MALDI untersucht worden und lassen sich so analysieren.

15 Derzeit ist diese Technologie in der Lage, im Massenbereich von 1.000 bis 4.000 Da, Moleküle mit einer Massendifferenz von 1 Da zu unterscheiden. Durch die natürliche Verteilung von Isotopen sind die meisten Biomoleküle jedoch schon etwa 5 Da breit. Technisch ist diese massenspektrometrische Methode also vorzüglich für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Vernünftigerweise müssen zu analysierende Produkte, die unterschieden werden sollen, also mindestens 5 Da auseinander liegen. In diesem Massenbereich könnten also 600 Moleküle unterschieden werden.

25 Ein Array mit vielen tausend Ziel-DNAs kann auf einer Festphase immobilisiert und anschließend können alle Ziel-DNAs gemeinsam auf das Vorhandensein einer Sequenz mittels einer Sonde (Nukleinsäure mit komplementärer Sequenz) untersucht werden.

30 Eine Übereinstimmung in der Ziel-DNA mit der Sonde kommt durch eine Hybridisation der zwei Teile miteinander zustande. Sonden können beliebige Nukleinsäuresequenzen von beliebiger Länge sein. Es existieren verschiedene Verfah-

ren für die Auswahl von optimalen Bibliotheken von Sonden-
sequenzen, welche minimal miteinander überlappen.
Sondensequenzen können auch gezielt zusammengestellt werden,
um bestimmte Ziel-DNA Sequenzen aufzufinden. Oligo-
fingerprinting ist ein Ansatz, bei welchem diese Technologie
zum Einsatz kommt. Eine Bibliothek von Ziel-DNAs wird mit
kurzen Nukleinsäuresonden abgetastet. Meist sind hier die
Sonden nur 8-12 Basen lang. Es wird jeweils eine Sonde auf
einmal an eine auf einer Nylonmembran immobilisierte
Ziel-DNA-Bibliothek hybridisiert. Die Sonde ist radioaktiv
markiert und die Hybridisierung wird anhand der Lokalisierung
der Radioaktivität beurteilt. Für die Abtastung eines
immobilisierten DNA-Arrays sind auch schon fluoreszent
markierte Sonden verwendet worden.

US 5,605,798 beschreibt die Abtastung von über Hybridisierung
immobilisierten Ziel-Nukleinsäuren mit Nukleinsäuresonden
und Massenspektrometrie. Hierbei wird jedoch weder gezielt
eine Identifikation von Methylierungsmustern durchgeführt,
noch werden modifizierte Nukleinsäuren (z. B. PNAs, Charge
Tags) eingesetzt, noch wird eine Genomamplifikation
durchgeführt.

Als Sonden kommen jegliche Moleküle in Frage, die sequenz-
spezifisch mit einer Ziel-DNA wechselwirken können. Am
gängigsten sind Oligodeoxyribonukleotide. Jedoch bietet
sich jede Modifikation von Nukleinsäuren an, z.B. Peptide
Nucleic Acids (PNA), Phosphorothioatoligonukleotide oder
Methylphosphonatoligonukleotide. Die Spezifität einer
Sonde ist sehr wesentlich. Phosphorothioatoligonukleotide
sind nicht allzugut geeignet, da ihre Struktur durch die
Schwefelatome und dadurch die Hybridisierungseigenschaft
gestört ist. Ein Grund hierfür könnte sein, daß Phosphorothioatoligonukleotide
normalerweise nicht diastereomerenrein synthetisiert werden.
Bei Methylphosphonatoligonukleotiden besteht ein ähnliches Pro-

blem, jedoch werden diese Oligonukleotide vermehrt diastereomerenrein synthetisiert. Ein wesentlicher Unterschied dieser Modifikation ist das ungeladene Rückgrat, welches zu einer verminderten Abhängigkeit der Hybridisation von Puffersalzen und insgesamt durch die geringere Abstoßung zu höherer Affinität führt. Peptide Nucleic Acids haben ebenfalls ein ungeladenes Rückgrat, welches gleichzeitig chemisch sehr stark von der gängigen Zucker-Phosphat Struktur des Rückgrats in Nukleinsäuren abweicht. Das Rückgrat einer PNA hat eine Amidsequenz anstelle des Zucker-Phosphat Rückgrats gewöhnlicher DNA. PNA hybridisiert sehr gut mit DNA komplementärer Sequenz. Die Schmelztemperatur eines PNA/DNA-Hybrids ist höher als die des entsprechenden DNA/DNA-Hybrids und wiederum ist die Abhängigkeit der Hybridisierung von Puffersalzen relativ gering.

Kombinatorische Synthesen, d.h. die Herstellung von Substanzbibliotheken ausgehend von einem Gemisch von Vorstufen, werden sowohl auf fester als auch in flüssiger Phase durchgeführt. Vor allem die kombinatorische Festphasensynthese hat sich frühzeitig etabliert, da in diesem Fall die Abtrennung von Nebenprodukten besonders einfach ist. Nur die an den Support gebundenen Zielverbindungen werden in einem Waschschrift zurückbehalten und am Ende der Synthese durch das gezielte Spalten eines Linkers isoliert. Diese Technik erlaubt auf einfachem Wege die gleichzeitige Synthese einer Vielzahl verschiedener Verbindungen an einer Festphase und somit den Erhalt von chemisch "reinen" Substanzbibliotheken.

Daher sind die Verbindungsklassen, die auch in nicht kombinatorischen, konventionellen Synthesen auf einer Festphase synthetisiert werden, der kombinatorischen Chemie besonders leicht zugänglich und werden demzufolge auch

breit verwendet. Dies trifft vor allem auf Peptid-, Nukleinsäure- und PNA-Bibliotheken zu.

Die Synthese von Peptiden erfolgt durch Binden der ersten N-geschützten Aminosäure (z.B. Boc) an den Support, nachfolgende Entschützung und Reaktion der zweiten Aminosäure mit der freigewordenen NH₂-Gruppe der ersten. Nicht reagierte Aminofunktionen werden in einem weiteren "Capping" Schritt einer Weiterreaktion im nächsten Synthesesyklus entzogen. Die Schutzgruppe an der Aminofunktion der zweiten Aminosäure wird entfernt und der nächste Baustein kann gekoppelt werden. Zur Synthese von Peptidbibliotheken wird ein Gemisch von Aminosäuren in einem oder mehreren Schritten verwendet. Die Synthese von PNA und PNA-Bibliotheken erfolgt sinngemäß.

Nukleinsäure-Bibliotheken werden meist durch Festphasensynthese mit Gemischen verschiedener Phosphoramidit-Nukleoside erhalten. Dies kann auf kommerziell erhältlichen DNA-Synthesizern ohne Veränderungen in den Syntheseprotokollen durchgeführt werden.

Verschiedene Arbeiten zur kombinatorischen Synthese von PNA Bibliotheken sind publiziert worden. Diese Arbeiten behandeln den Aufbau von kombinatorischen Sequenzen, d.h. die Synthese von PNAs in denen einzelne, spezifische Basen in der Sequenz durch degenerierte Basen ersetzt werden und dadurch zufällige Sequenzvarianz erreicht wird.

Die Verwendung massenspektrometrischer Methoden für die Analyse kombinatorischer Bibliotheken ist mehrfach beschrieben worden.

Es existieren verschiedene Verfahren um DNA zu immobilisieren. Das bekannteste Verfahren ist die Festbindung einer DNA, welche mit Biotin funktionalisiert ist, an eine

Streptavidin-beschichtete Oberfläche. Die Bindungsstärke dieses Systems entspricht einer kovalenten chemischen Bindung ohne eine zu sein. Um eine Ziel-DNA kovalent an eine chemisch vorbereitete Oberfläche binden zu können, bedarf es einer entsprechenden Funktionalität der Ziel-DNA. DNA selbst besitzt keine Funktionalisierung, die geeignet ist. Es gibt verschiedene Varianten in eine Ziel-DNA eine geeignete Funktionalisierung einzuführen: Zwei leicht zu handhabende Funktionalisierungen sind primäre, aliphatische Amine und Thiole. Solche Amine werden quantitativ mit N-Hydroxy-succinimidestern umgesetzt und Thiole reagieren unter geeigneten Bedingungen quantitativ mit Alkyljodiden. Eine Schwierigkeit besteht im Einführen einer solchen Funktionalisierung in eine DNA. Die einfachste Variante ist die Einführung durch einen Primer einer PCR. Gezeigte Varianten benützen 5'-modifizierte Primer (NH₂ und SH) und einen bifunktionalen Linker.

Ein wesentlicher Bestandteil der Immobilisierung auf einer Oberfläche ist ihre Beschaffenheit. Bis jetzt beschriebene Systeme sind hauptsächlich aus Silizium oder Metall (magnetic beads). Eine weitere Methode zur Bindung einer Ziel-DNA basiert darauf, eine kurze Erkennungssequenz (z.B. 20 Basen) in der Ziel-DNA zur Hybridisierung an ein oberflächenimmobilisiertes Oligonukleotid zu verwenden.

Es sind auch enzymatische Varianten zur Einführung von chemisch aktivierten Positionen in eine Ziel-DNA beschrieben worden. Hier wird an einer Ziel-DNA enzymatisch eine 5'-NH₂-Funktionalisierung durchgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik überwindet und in der Lage ist, effektiv und hochparallel-

lisiert Cytosin-Methylierungen in einem Array von immobilisierten genomischen DNA-Proben aufzuzeigen.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Auffindung von epigenetischen Informationsträgern in Form von 5-Methylcytosin-Basen in genomischer DNA, das eine Vielzahl von Sonden gleichzeitig zur massenspektrometrischen Untersuchung eines Arrays von Ziel-

10 Nukleinsäuren verwendet.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst, in dem ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben zur Verfügung gestellt wird, bei dem man:

15

a) eine genomische DNA-Probe chemisch derart behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und man in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte erhält;

20

b) Teile der so behandelten DNA-Probe enzymatisch amplifiziert;

25 c) die amplifizierten Teile der so behandelten DNA-Probe an eine Oberfläche bindet;

d) einen Satz von Sonden unterschiedlicher Nukleobasensequenzen, die jeweils mindestens einmal die Dinukleotidsequenz 5'-CpG-3' enthalten, an die immobilisierten DNA-

30 Proben hybridisiert;

e) die nicht hybridisierten Sonden abtrennt;

35 f) die hybridisierten Sonden in einem Massenspektrometer analysiert, wobei die Position der Sonden auf dem Proben-träger eine Zuordnung zu der hybridisierenden DNA-Probe

erlaubt;

g) Übertragung der aus den Massenspektren erhaltenen Peakmuster in Methylierungsmuster und Abgleich der neuen
5 Daten mit einer Datenbank.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man in c) ein oder mehrere amplifizierte genomische DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen, die kovalent an die Oberfläche gebunden sind,
10 immobilisiert.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, daß nach der Hybridisierung ein Cross-Linking der genomischen DNA-Fragmente mit den an der Oberfläche gebundenen Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen erfolgt. Besonders bevorzugt ist hierbei, daß man zum Cross-Linking kovalente chemische Bindungen ausbildet. Erfindungsgemäß bevorzugt ist hierbei ferner, daß man zum Cross-Linking elektrostatische Wechselwirkungen ausbildet.
15
20

Vorteilhaft ist es ferner, daß die an die Oberfläche gebundenen Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen 5-Bromuracil-Bausteine enthalten.
25

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß die immobilisierten komplementären Oligonukleotidsequenzen modifizierte Basen, Ribose oder Rückgrateinheiten beinhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist ferner dadurch gekennzeichnet, daß man in b) die genomische DNA-Probe in Form mehrerer amplifizierter Fragmente vermehrt, so daß man mindestens 0,01 % des gesamten Genoms amplifiziert.
30

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es auch, daß man die Mischung amplifizierter DNA-Fragmente auf eine Oberfläche
35

bindet, auf der eine Vielzahl von unterschiedlichen Punkten angeordnet ist die jeweils in der Lage sind, unterschiedliche Teile der amplifizierte DNA-Probe zu binden.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist ferner, daß man in d) einen Satz von Sonden verwendet, welcher die Dinukleotid-Sequenz 5'-CpG-3' nur einmal je Sonde enthält und die Sonden ansonsten jeweils entweder keine Cytosin oder keine Guanin Basen umfassen.

10

Außerdem ist es erfindungsgemäß bevorzugt, daß man Schritt a) eine Bisulfit- oder Pyrosulfit- oder Disulfitlösung oder eine Mischung aus den angegebenen Lösungen, zusammen mit anderen Reagenzien für die spezifische oder
15 hinreichend selektive Umwandlung von Cytosin in Uracil verwendet.

20

Vorteilhaft ist es auch, daß die zur Immobilisierung von amplifizierter Proben-DNA verwendete Oberfläche zugleich der Probenträger für ein Massenspektrometer ist. Bevorzugt ist es dabei, daß man die zur Immobilisierung von amplifizierter Proben-DNA verwendete Oberfläche als ganzes vor f) auf einen Probenträger für ein Massenspektrometer aufbringt. Bevorzugt ist es hierbei auch, daß man
25 die hybridisierten Sonden vor dem, nach dem oder durch den Kontakt mit einer Matrix von den immobilisierten amplifizierten DNA-Proben ablöst.

30

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, daß die Sonden Nukleinsäuren sind, die ein oder mehrere Massen-Tags tragen. Erfindungsgemäß vorteilhaft ist es auch, daß ein oder mehrere Massen-Tags zugleich Ladungs-Tags sind. Oder daß die Sonden zusätzlich ein Ladungs-Tag tragen.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß die Sonden modifizierte Nukleinsäuremoleküle sind. Hierbei ist besonders

bevorzugt, daß die modifizierten Nukleinsäuremoleküle PNAs, alkylierte Phosphorothioatnukleinsäuren oder Alkylphosphonatnukleinsäuren sind.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man die Sonden durch kombinatorische Synthese herstellt. Dabei ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, daß man unterschiedliche Basenbausteine derart markiert, daß die aus ihnen synthetisierten Sonden jeweils über ihre Massen im Mas-

10 senspektrometer unterscheidbar sind.

Erfindungsgemäß vorteilhaft ist es ferner, daß man die Sonden als Teilbibliotheken herstellt und diese mit unterschiedlichen Massen- und/oder Ladungs-Tags versieht.

15

Ganz besonders erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man in f) matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ausführt.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend einen Probenträger für ein Massenspektrometer, welcher derart modifiziert ist, daß beliebig wählbare Teile eines Genoms an diesen immobilisiert wer-

25 den und/oder Sondenbibliotheken, mit denen man die an den Probenträger immobilisierte DNA massenspektrometrisch analysiert und/oder weiteren Chemikalien, Lösungsmitteln und/oder Hilfsstoffen sowie gegebenenfalls einer Bedienungsanleitung.

30 Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur Identifikation von 5-Methylcytosin-Positionen in genomischer DNA, die unterschiedlichsten Ursprungs sein kann. Die genomische DNA wird zunächst chemisch so behandelt, daß sich ein Un-

35 terschied in der Reaktion der Cytosin-Basen zu den 5-Methylcytosin-Basen ergibt. Mögliche Reagenzien sind hier

z. B. Disulfit (auch als Bisulfit bezeichnet), Hydrazin und Permanganat. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird die genomische DNA mit Disulfit in Gegenwart von Hydrochinon oder Hydrochinonderivaten behandelt, wobei selektiv nach anschließender alkalischer Hydrolyse die Cytosin-Basen in Uracil umgewandelt werden. 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Nach einem Aufreinigungsprozeß, der der Abtrennung des überschüssigen Disulfits dient, werden bestimmte Abschnitte der vorbehandelten genomischen DNA in einer Polymerasereaktion amplifiziert. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird hier die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird die Polymerasekettenreaktion so durchgeführt, daß mindestens 0.01% des gesamten Genoms in Form mehrerer Fragmente amplifiziert werden.

Die amplifizierte, vorbehandelte DNA-Probe kann nun in mehreren Varianten des Verfahrens an eine Oberfläche immobilisiert werden. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt die Immobilisierung an die Oberfläche derart, daß diese zuvor mit Oligonukleotiden oder kurzen PNA (Peptide nucleic acids) -Sequenzen modifiziert wurde und damit eine Hybridisierung komplementärer Sequenzen in der DNA-Probe erfolgt. Grundsätzlich können die immobilisierten Oligonukleotide sowohl an den Basen, an der (Desoxy)-Ribose und/oder am Rückgrat gegenüber herkömmlicher DNA modifiziert sein. Werden nun verschiedene Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen in Form eines Arrays an diese Oberfläche gebunden oder auf ihr synthetisiert, so kann jede dieser unterschiedlichen Sequenzen unterschiedliche Teile der amplifizierten DNA-Fragmente binden. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird im Anschluß an die Hybridisierung ein Cross-Linking der beiden Stränge durchgeführt. Die kann durch Ausbildung einer kovalenten chemischen Bindung oder einer stabilen

elektrostatischen Wechselwirkung erfolgen. In einer weiteren bevorzugten Variante wird ein photochemisches Cross-Linking über Bromuracil-Bausteine durchgeführt.

- 5 Auch ist es möglich, Fragmente der vorbehandelten genomischen DNA separat zu amplifizieren und die Produkte einzeln an unterschiedlichen Orten auf der Oberfläche zu immobilisieren. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens erfolgt dies derart, daß einer der PCR-Primer eine
10 zur Immobilisierung geeignete Funktion trägt, die mit einer auf der Oberfläche angebrachten Funktionalität eine Bindung eingehen kann.

- 15 Die Oberfläche, an die die amplifizierten DNA-Fragmente gebunden werden, soll sich entweder auf den Probenträger eines MALDI-Massenspektrometers übertragen lassen oder aber selbst dieser Probenträger sein. Die Konstruktion und Software des Massenspektrometers gewährleistet dabei, daß der jeweils untersuchte Punkt auf dem Probenträger
20 den dort ursprünglich gebundenen Proben zugeordnet werden kann.

- An die immobilisierten amplifizierten DNA-Fragmente wird nun ein Satz von Sonden hybridisiert, wobei diese Sonden
25 je wenigstens einmal die Sequenz 5'-CpG-3' und ansonsten jeweils entweder keine Cytosin oder Guanin Basen enthalten. Die Sonden können Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide oder PNAs (Peptide nucleic acids) sein. In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird dieser Satz
30 von Sonden in einem kombinatorischen Syntheseansatz als kombinatorische Bibliothek hergestellt. In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Sonden über ihre Massen eindeutig unterscheidbar, so daß ein Rückschluß von der Masse auf die Sequenz möglich ist. Dazu
35 können die Sonden mit Massentags versehen sein, die die Massengleichheit unterschiedlicher Sonden verhindern. Die

Sonden können mit Ladungstags versehen sein, um eine bessere Darstellbarkeit im Massenspektrometer zu erreichen und um die Stabilität der Analyse in Anwesenheit von Salzen und Detergenzien zu erhöhen. Die Massentags können
5 zugleich Ladungstags sein. Die Sonden können auch als kombinatorische Teilbibliotheken hergestellt werden, die wiederum unterschiedliche Massen- und/oder Ladungstags tragen. Die Sonden können PNAs, unmodifizierte Nukleinsäuremoleküle oder modifizierte Nukleinsäuremoleküle wie
10 Phosphothioatnukleinsäuren, alkylierte Phosphorothioatnukleinsäuren oder Alkylphosphonatnukleinsäuren sein, unbeschadet einer weiteren Modifikation durch Massen- und Ladungstags.

15 Die nicht hybridisierten Sonden werden in einem oder mehreren Waschschritten abgetrennt. Die hybridisierten Sonden bleiben dabei an ihren Positionen.

Die Oberfläche wird auf dem MALDI-Probenträger befestigt
20 und in das Massenspektrometer transferiert bzw. unmittelbar transferiert, wenn das Verfahren auf dem MALDI-Probenträger selbst durchgeführt wurde. Der Array von Proben wird nun auf hybridisierte Sonden hin massenspektrometrisch untersucht. Die hybridisierten Sonden werden
25 dazu in einer bevorzugten Variante des Verfahrens durch den Kontakt mit der MALDI-Matrix dehybridisiert und in diese eingebettet; durch die Geschwindigkeit in der die Matrix aufgebracht wird erfolgt aber keine gegenseitige Kontamination der benachbarten Punkte. An jedem Punkt er-
30 geben die hybridisierten Sonden ein Peakmuster, über das auf die Sequenzen geschlossen werden kann, an denen eine Hybridisierung erfolgte. Aufgrund der Vorbehandlung (vorzugsweise mit Bisulfit) ergeben unterschiedlich am Cytosin methylierte DNA-Fragmente unterschiedliche Se-
35 quenzen. Daher sind die durch die Sonden erzeugten Peakmuster im Massenspektrometer charakteristische Methylier-

rungsmuster der jeweils untersuchten DNA-Probe. Es erfolgt ein Abgleich dieser Methylierungsmuster mit denen einer Datenbank.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifikation von Cytosin-
5 Methylierungsmustern in genomischen DNA-Proben da-
durch gekennzeichnet, daß man:
- a) eine genomische DNA-Probe chemisch derart behan-
delt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich
10 reagieren und man in der Duplex ein unterschiedliches
Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte erhält;
- b) Teile der so behandelten DNA-Probe enzymatisch
amplifiziert;
15
- c) die amplifizierten Teile der so behandelten DNA-
Probe an eine Oberfläche bindet;
- d) einen Satz von Sonden unterschiedlicher Nukleoba-
sensequenzen, die jeweils mindestens einmal die Dinu-
20 kleotidsequenz 5'-CpG-3' enthalten, an die immobili-
sierten DNA-Proben hybridisiert;
- e) die nicht hybridisierten Sonden abtrennt;
25
- f) die hybridisierten Sonden in einem Massenspektro-
meter analysiert, wobei die Position der Sonden auf
dem Probenträger eine Zuordnung zu der hybridisieren-
den DNA-Probe erlaubt;
30
- g) Übertragung der aus den Massenspektren erhaltenen
Peakmuster in Methylierungsmuster und Abgleich der
neuen Daten mit einer Datenbank.
- 35 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß man in c) ein oder mehrere amplifizierte genomi-

sche DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen, die kovalent an die Oberfläche gebunden sind, immobilisiert.

5

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Hybridisierung ein Cross-Linking der genomischen DNA-Fragmente mit den an der Oberfläche gebundenen Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen erfolgt.

10

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zum Cross-Linking kovalente chemische Bindungen ausbildet.

15

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man zum Cross-Linking elektrostatische Wechselwirkungen ausbildet.

20

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die an die Oberfläche gebundenen Oligonukleotid- oder PNA-Sequenzen 5-Bromuracil-Bausteine enthalten.

25

7. Verfahren nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierten komplementären Oligonukleotidsequenzen modifizierte Basen, Ribose oder Rückgrateinheiten beinhalten.

30

8. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man in-b) die genomische DNA-Probe in Form mehrerer amplifizierter Fragmente vermehrt, so daß man mindestens 0,01 % des gesamten Genoms amplifiziert.

35

- 5 9. Verfahren nach mindestens einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Mischung amplifizierter DNA-Fragmente auf eine Oberfläche bindet, auf der eine Vielzahl von unterschiedlichen Punkten angeordnet ist die jeweils in der Lage sind, unterschiedliche Teile der amplifizierten DNA-Probe zu binden.
- 10 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man in d) einen Satz von Sonden verwendet, welcher die Dinukleotid-Sequenz 5'-CpG-3' nur einmal je Sonde enthält und die Sonden ansonsten jeweils entweder keine Cytosin oder keine Guanin Basen enthalten.
- 15 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Schritt a) eine Bisulfit- oder Pyrosulfit- oder Disulfitlösung oder eine Mischung aus den angegebenen Lösungen, zusammen mit anderen Reagenzien für die spezifische oder hinreichend selektive Umwandlung von Cytosin in Uracil verwendet.
- 20 12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Immobilisierung von amplifizierter Proben-DNA verwendete Oberfläche zugleich der Probenträger für ein Massenspektrometer ist.
- 25 13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die zur Immobilisierung von amplifizierter Proben-DNA verwendete Oberfläche als ganzes vor f) auf einen Probenträger für ein Massenspektrometer aufbringt.
- 30 35

- 5 14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man die hybridisierten Sonden vor dem, nach dem oder durch den Kontakt mit einer Matrix von den immobilisierten amplifizierten DNA-Proben ablöst.
- 10 15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden Nukleinsäuren sind, die ein oder mehrere Massen-Tags tragen.
- 15 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Massen-Tags zugleich Ladungs-Tags sind.
- 20 17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden zusätzlich ein Ladungs-Tag tragen.
- 25 18. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden modifizierte Nukleinsäuremoleküle sind.
- 30 19. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Nukleinsäuremoleküle PNAs, alkylierte Phosphorothioatnukleinsäuren oder Alkylphosphonatnukleinsäuren sind.
- 35 20. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sonden durch kombinatorische Synthese herstellt.
21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man unterschiedliche Basenbausteine derart markiert, daß die aus ihnen synthetisierten Sonden jeweils über ihre Massen im Massenspektrometer unterscheidbar sind.

22. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Sonden als Teilbibliotheken herstellt und diese mit unterschiedlichen Massen- und/oder Ladungs-Tags versieht.

5

23. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man in f) matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) ausführt.

10

24. Kit für die Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, umfassend einen Probenträger für ein Massenspektrometer, welcher derart modifiziert ist, daß beliebig wählbare Teile eines Genoms an diesen immobilisiert werden und/oder Sondenbibliotheken, mit denen man die an den Probenträger immobilisierte DNA massenspektrometrisch analysiert und/oder weiteren Chemikalien, Lösungsmitteln und/oder Hilfsstoffen sowie gegebenenfalls einer Bedienungsanleitung.

15

20

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. August 2000 (03.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/44934 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00288

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Januar 2000 (27.01.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 05 082.1 29. Januar 1999 (29.01.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EPIGENOMICS GMBH [DE/DE]; Kastanienallee
24, D-10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexander
[DE/DE]; Kyffhäuserstrasse 20, D-10781 Berlin (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Joachimstrasse 9,
D-10119 Berlin-Mitte (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 30. November 2000

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING CYTOSINE METHYLATION PATTERNS IN GENOMIC DNA SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIKATION VON CYTOSIN-METHYLIERUNGSMUSTERN IN GENOMI-
SCHEN DNA-PROBEN

(57) Abstract: The invention relates to a method of identifying cytosine methylation patterns in genomic DNA samples. The inven-
tive method comprises the following steps: a) chemically treating a genomic DNA sample in such a manner that the cytosine and the
5-methyl cytosine react differently and that the two products have a different base-pairing behavior in the duplex; b) enzymatically
amplifying parts of the DNA sample treated in this manner; c) binding the amplified parts of the DNA sample treated in this manner
to a surface; d) hybridizing a set of probes of different nucleic base sequences to the immobilized DNA samples, said respective base
sequences containing at least once the dinucleotide sequence 5'-CpG-3'; e) removing the non-hybridized probes; f) analyzing the
hybridized probes in a mass spectrometer, the position of the probes on the sample carrier allowing an allocation of the DNA sample
to be hybridized; g) converting the peak-patterns obtained from the mass-specters to methylation patterns and matching the new data
with a data library.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern in genomi-
schen DNA-Proben, wobei man a) eine genomische DNA-Probe chemisch derart behandelt, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unter-
schiedlich reagieren und man in der Duplex ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten der beiden Produkte erhält; b) Teile der
so behandelten DNA-Probe enzymatisch amplifiziert; c) die amplifizierten Teile der so behandelten DNA-Probe an eine Oberfläche
bindet; d) einen Satz von Sonden unterschiedlicher Nukleobasensequenzen, die jeweils mindestens einmal die Dinukleotidsequenz
5'-CpG-3' enthalten, an die immobilisierten DNA-Proben hybridisiert; e) die nicht hybridisierten Sonden abtrennt; f) die hybridi-
sierten Sonden in einem Massenspektrometer analysiert, wobei die Position der Sonden auf dem Probenträger eine Zuordnung zu der
hybridisierenden DNA-Probe erlaubt; g) Übertragung der aus den Massenspektren erhaltenen Peakmuster in Methylierungsmuster
und Abgleich der neuen Daten mit einer Datenbank.

WO 00/44934 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00288

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 26, no. 10, 1998, XP002143106 cited in the application the whole document	1-24
Y	US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25 February 1997 (1997-02-25) the whole document	1-24
A	PAUL C L ET AL: "Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis." BIOTECHNIQUES, (1996 JUL) 21 (1) 126-33. , XP002143107 the whole document	1-11
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 2000

Date of mailing of the international search report

07/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/00288

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 195 43 065 A (OLEK ALEXANDER) 15 May 1997 (1997-05-15) cited in the application the whole document	1-24
A	WO 97 37041 A (SEQUENOM INC) 9 October 1997 (1997-10-09) abstract page 21-24	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00288

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5605798	A	25-02-1997	US 5547835 A	20-08-1996
			AU 5365196 A	08-10-1996
			CA 2214359 A	26-09-1996
			CN 1202204 A	16-12-1998
			EP 0815261 A	07-01-1998
			JP 11508122 T	21-07-1999
			WO 9629431 A	26-09-1996
			US 6043031 A	28-03-2000
			US 5691141 A	25-11-1997
			AU 694940 B	06-08-1998
			AU 5992994 A	15-08-1994
			AU 9137998 A	14-01-1999
			CA 2153387 A	21-07-1994
			EP 0679196 A	02-11-1995
			JP 8509857 T	22-10-1996
			WO 9416101 A	21-07-1994
DE 19543065	A	15-05-1997	WO 9717461 A	15-05-1997
			EP 0870062 A	14-10-1998
WO 9737041	A	09-10-1997	AU 2217597 A	22-10-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00288

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 10, 1998, XP002143106 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24
Y	US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25. Februar 1997 (1997-02-25) das ganze Dokument	1-24
A	PAUL C L ET AL: "Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis." BIOTECHNIQUES, (1996 JUL) 21 (1) 126-33. , XP002143107 das ganze Dokument	1-11

—/—



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindereischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindereischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00288

II

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 43 065 A (OLEK ALEXANDER) 15. Mai 1997 (1997-05-15) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24
A	WO 97 37041 A (SEQUENOM INC) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Zusammenfassung Seite 21-24	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00288

Recherchenbericht führtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
S 5605798 A	25-02-1997	US 5547835 A	20-08-1996
		AU 5365196 A	08-10-1996
		CA 2214359 A	26-09-1996
		CN 1202204 A	16-12-1998
		EP 0815261 A	07-01-1998
		JP 11508122 T	21-07-1999
		WO 9629431 A	26-09-1996
		US 6043031 A	28-03-2000
		US 5691141 A	25-11-1997
		AU 694940 B	06-08-1998
		AU 5992994 A	15-08-1994
		AU 9137998 A	14-01-1999
		CA 2153387 A	21-07-1994
		EP 0679196 A	02-11-1995
		JP 8509857 T	22-10-1996
		WO 9416101 A	21-07-1994
IE 19543065 A	15-05-1997	WO 9717461 A	15-05-1997
		EP 0870062 A	14-10-1998
IO 9737041 A	09-10-1997	AU 2217597 A	22-10-1997

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 08 MAY 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1096/WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00288	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 29/01/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder EPIGENOMICS AG et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 15/08/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 04.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bigot-Maucher, C Tel. Nr. +49 89 2399 7415



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-17 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-24 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00288

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	24
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-23
	Nein: Ansprüche	24
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-24
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Die mit einem Schreiben vom 5.2.2001 eingereichten Argumente des Anmelders wurden bei der Erstellung dieses Internationalen vorläufigen Prüfungsberichts berücksichtigt.

Punkt V:

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: NUCLEIC ACIDS RESEARCH,
Bd. 26, Nr. 10, 1998, in der Anmeldung erwähnt
- D2: US-A-5 605 798
- D3: BIOTECHNIQUES, Band 21, Nr. 1, 1996, Seiten 126-133
- D4: DE-A-195 43 065, in der Anmeldung erwähnt
- D5: WO-A-97 37041

1. Artikel 33(2) PCT

- 1.1. Der Gegenstand der **Ansprüche 1-23** wird als **neu** angesehen (Artikel 33(2) PCT). Kein Dokument des Standes der Technik stellt ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern bereit, wobei die DNA-Probe so behandelt wird, daß Cytosin und 5-Methylcytosin unterschiedlich reagieren und eine Analyse mit einem Massenspektrometer erfolgt.
- 1.2. Der Gegenstand des **unabhängigen Anspruchs 24** wird aus folgenden Gründen **nicht als neu** angesehen (Artikel 33(2) PCT).
Aufgrund der Formulierung des Anspruchs kann der Kit lediglich aus einer der beanspruchten Komponenten bestehen. Damit sind beispielsweise D2 (Anspruch 2), D4 (Anspruch 3) und D5 (Anspruch 39) neuheitsschädlich, da sie einen festen Träger/Matrix für ein Massenspektrometer offenbaren, woran Nukleinsäuren gebunden werden. Des weiteren sind jegliche Sondenbibliotheken, Chemikalien, Lösungsmittel und Hilfsstoffe neuheitsschädlich für Anspruch 24.

2. Artikel 33(3) PCT

- 2.1. Der Gegenstand von **Anspruch 1** wird als neu gegenüber dem nächsten Stand der Technik D1 angesehen, da ausschließliche CpG-enthaltende Sonden und eine massenspektrometrische Analyse für die Sequenzierung benutzt werden.

D1 beschreibt eine Methode zur Identifikation von 5-Methylcytosin in DNA-Genomen, wobei die denaturierte DNA chemisch mit Bisulfit behandelt wird. Diese behandelte DNA wird mit PCR amplifiziert. Die amplifizierte DNA wird beispielsweise mit der GENESCANTM-Methode sequenziert und auf 5-Methylcytosin untersucht (Seite 2259, 2.-3. Spalte, überbrückender Absatz; Fig. 2; siehe auch D3, Zusammenfassung). Primer, die spezifisch m⁵CpG-DNA amplifizieren, können benutzt werden (Seite 2259, rechte Spalte, letzter Absatz).

Die mit dem **unabhängigen Anspruch 1** zu lösende technische Aufgabe im Licht von D1 war es, ein Verfahren zur Identifikation von Cytosin-Methylierungsmustern bereitzustellen, welches es ermöglicht, PCR's im Verfahren zu verwenden, die große Teile des Genoms amplifizieren.

Diese Aufgabe wurde wie oben angegeben gelöst.

D2 offenbart ein Verfahren zur Detektion von bestimmten Nukleinsäuresequenzen in einer Probe mit Hilfe einer Amplifikation und anschließender Massenspektrometrie als Sequenzierungsmethode (Ansprüche 1 und 10). Hierbei muß die Sequenz der zu bestimmenden Nukleinsäuren bekannt sein, damit die hybridisierenden Primer hergestellt werden können (Spalte 4, Z 4-7).

Der Fachmann konnte aus D2 nicht ableiten, daß durch die Benutzung von CpG-enthaltenden Sonden Massenspektrometrie zur Identifikation von Methylierungsmustern von großen Teilen des Genoms möglich wird. In diesem Dokument werden keine CpG-enthaltenden Sonden verwendet. D2 gibt auch keinen Hinweis darauf, daß Massenspektrometrie für die Identifikation von Methylierungsmustern geeignet ist.

Aus diesen Gründen wird der **unabhängige Anspruch 1 als erfinderisch** im

Sinne von Artikel 33(3) PCT angesehen.

Dasselbe gilt für die **abhängigen Ansprüche 2-23**.

Punkt VII:

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D2-D3 und D5 offenbarte einschlägige Stand der Technik, noch diese Dokumente angegeben.

Punkt VIII:

1. Anspruch 8 genügt nicht den Erfordernissen von Artikel 6 PCT, da der Gegenstand nicht klar definiert ist. Im Anspruch wird das Verfahren durch das zu erreichende Ergebnis ("mindestens 0.01% des gesamten Genoms amplifiziert") definiert. Die technischen Merkmale, die für das Erreichen dieses Ergebnisses nötig sind, sind nicht in den Anspruch aufgenommen worden.
2. Der Gegenstand des Anspruchs 24 ist unklar (Artikel 6 PCT), da er das Merkmal "Bedienungsanleitung" enthält, welches nicht als technisches Merkmal für einen Kit angesehen wird (siehe Regel 6.3(a) PCT und Richtlinien, IV, 2.4(e)).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 September 2000 (29.09.00)	
International application No. PCT/DE00/00288	Applicant's or agent's file reference E01/1096/WO
International filing date (day/month/year) 27 January 2000 (27.01.00)	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
Applicant OLEK, Alexander	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

15 August 2000 (15.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHUBERT, Klemens
Joachimstrasse 9
D-10119 Berlin-Mitte
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 18 January 2001 (18.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference E01/1096/WO	
International application No. PCT/DE00/00288	International filing date (day/month/year) 27 January 2000 (27.01.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☐ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address EPIGENOMICS GMBH Kastanienallee 24 D-10435 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49304404090	
	Facsimile No. +493044040999	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☒ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address EPIGENOMICS AG Kastanienallee 24 D-10435 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49304404090	
	Facsimile No. +493044040999	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Ellen Moyse Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts E01/1096/W0	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 00288	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/01/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 29/01/1999
Anmelder EPIGENOMICS GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. ---

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETERecherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE ÜNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	✓ REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" <i>ok</i> NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd. 26, Nr. 10, 1998, XP002143106 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24
Y	✓ US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25. Februar 1997 (1997-02-25) das ganze Dokument	1-24
A	✓ PAUL C L ET AL: "Cytosine methylation: quantitation by automated genomic sequencing and GENESCAN analysis." BIOTECHNIQUES, (1996 JUL) 21 (1) 126-33. <i>ok</i> XP002143107 das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

07/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Reuter, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00288

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 195 43 065 A (OLEK ALEXANDER) ^{ok} 15. Mai 1997 (1997-05-15) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-24
A	WO 97 37041 A (SEQUENOM INC) ^{ok} 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Zusammenfassung Seite 21-24	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00288

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5605798 A	25-02-1997	US 5547835 A	20-08-1996
		AU 5365196 A	08-10-1996
		CA 2214359 A	26-09-1996
		CN 1202204 A	16-12-1998
		EP 0815261 A	07-01-1998
		JP 11508122 T	21-07-1999
		WO 9629431 A	26-09-1996
		US 6043031 A	28-03-2000
		US 5691141 A	25-11-1997
		AU 694940 B	06-08-1998
		AU 5992994 A	15-08-1994
		AU 9137998 A	14-01-1999
		CA 2153387 A	21-07-1994
		EP 0679196 A	02-11-1995
		JP 8509857 T	22-10-1996
		WO 9416101 A	21-07-1994
DE 19543065 A	15-05-1997	WO 9717461 A	15-05-1997
		EP 0870062 A	14-10-1998
WO 9737041 A	09-10-1997	AU 2217597 A	22-10-1997